

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791609

研究課題名（和文） 歯肉増殖症の歯肉における MMPs/TIMPs のバランス

研究課題名（英文） The balance of MMPs/TIMPs in gingival tissues of gingival overgrowth

研究代表者

中曾根 直弘 (NAKASONE NAOHIRO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20447634

研究成果の概要（和文）：歯肉増殖症および歯周炎歯肉における metalloproteinases (MMPs)-1 および tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1, -2, -3, -4 遺伝子、タンパク質局在を解析した。特に TIMP-3, -4 遺伝子発現、タンパク質局在に関しては、研究成果をまとめ歯科国際誌である *Archives of Oral Biology* に投稿し受理、発刊された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed gene expression and protein localization of metalloproteinases (MMP)-1 and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1, -2, -3, and -4 in gingival tissues of gingival overgrowth and periodontitis. In particular, our data in TIMP-3 and -4 mRNA expression and protein localization accepted and published in *Archives of Oral Biology*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯肉増殖症、tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)、metalloproteinases (MMPs)、歯周炎、calcium-channel blocker

1. 研究開始当初の背景

MMPs および TIMPs のバランスの破綻はリウマチ、癌、歯周病といった様々な病態において生じることが報告されている。歯周病においては MMPs および TIMPs は付着の喪失および歯槽骨吸収の進行と抑制に深く関与することが知られている。我々はこれまでに歯周炎罹患歯肉における MMPs と TIMPs 遺伝子発現を報告した。

そこで今回我々は歯肉増殖症の歯肉における MMPs と TIMPs 発現に着目した。歯肉増殖症も MMPs と TIMPs のバランスが発症に大きく関係すると考えられている。最近の

研究で Hemmann らは肝臓の線維症に MMPs と TIMPs が重要な役割を演じることを報告した。したがって、歯肉の線維症である歯肉増殖症でも MMPs と TIMPs のバランスが破綻している可能性が大きい。しかしながら、まだ MMPs と TIMPs の詳細な発現、特に TIMPs の発現に関しては TIMP-1 以外は全く解析されておらず、他の TIMPs についても調査の必要がある。

2. 研究の目的

歯肉増殖症の歯肉での MMPs と TIMPs 遺伝子発現の定量解析および免疫陽性細胞分

布を解析すること。

3. 研究の方法

(1) 対象者

・新潟大学医学総合病院 歯周病診療室を受診し、カルシウム拮抗薬型歯肉増殖症および慢性歯周炎と診断され、インフォームドコンセントの得られた患者 30 人。

(2) 試料採取

・歯周外科時に歯周ポケット底相当部上皮および結合組織を鋭利なメスで一塊に除去し採取した。歯肉を採取後PCR用試料はRNA安定化溶液に保存した。組織解析用試料は4%パラホルムアルデヒドに24時間浸漬固定後PBSに保存した。

(3) RT-PCR解析

・歯肉検体はホモジェナイズ後、全RNAを抽出し、逆転写酵素反応によりcDNAを合成した。ABI PRISM 7900を用いて、このcDNAをテンプレートにreal time PCRを行いMMP-1および各TIMPs遺伝子の発現量を定量し、統計解析を行った。

(4) パラフィン切片作製

・通法に従ってパラフィンに包埋した。その後、ミクロトームにて5 μ mに薄切しパラフィン切片を作製した。

(5) 組織学的および免疫組織学的検索

・通法どおり脱パラフィン、脱水後にヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行った。
・免疫染色にはH-E染色した切片の連続切片を用いる。1次抗体に抗MMP-1、TIMP-1、-2、-3、-4ポリクローナル抗体を用いた。
・H-E所見および免疫組織所見は同一部位を写真撮影し、TIMP-1、-2、-3、-4の歯肉組織中での局在を解析した。

4. 研究成果

(1) TIMP-3,-4 遺伝子発現

歯肉増殖症歯肉および歯周炎歯肉においてTIMP-3、-4 mRNA発現に有意差は認められなかった。

		mean	SE	P-value
TIMP3	GO	3.60	0.57	0.88
	P	3.72	0.59	
TIMP4	GO	0.46	0.05	0.22
	P	0.92	0.36	

表 1. 歯肉増殖症および歯周炎歯肉におけるTIMP-3、-4 mRNA 発現

(2) TIMP-3,-4 タンパク質局在

1. 炎症を伴わない歯肉増殖症歯肉

TIMP-3 免疫弱陽性が線維芽細胞、血管内皮細胞、上皮基底層および傍基底層に認められた。

TIMP-4 免疫弱陽性が線維芽細胞、血管内皮細胞に見られ、TIMP-4 免疫弱陽性が炎症性細胞、上皮基底層および傍基底層に認められた。

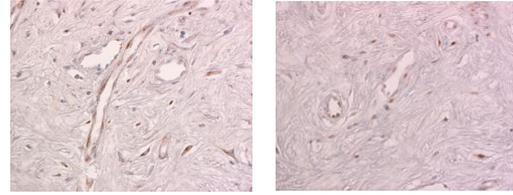


図 1: 炎症を伴わない歯肉増殖症歯肉におけるTIMP-3(左)およびTIMP-4(右)免疫染色所見

2. 炎症を伴う歯肉増殖症歯肉

TIMP-3 免疫強陽性が血管内皮細胞に見られる一方、TIMP-3 免疫弱陽性が線維芽細胞に認められた。上皮基底層および傍基底層もTIMP-3 免疫陽性を示した。

TIMP-4 免疫強陽性が血管内皮細胞、炎症性細胞、上皮基底層および傍基底層に認められ、線維芽細胞はTIMP-4 免疫弱陽性を示した。

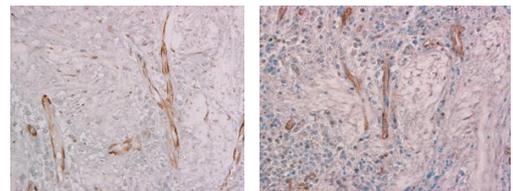


図 2: 炎症を伴った歯肉増殖症歯肉におけるTIMP-3(左)およびTIMP-4(右)免疫染色所見

3. 歯周炎歯肉

TIMP-3 免疫弱陽性が血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮基底層および傍基底層に認められた。

炎症性細胞はTIMP-4 免疫強陽性を示す一方、線維芽細胞、血管内皮細胞はTIMP-4 免疫弱陽性を示した。またTIMP-4 タンパク質は上皮基底層および傍基底層においても局在した。

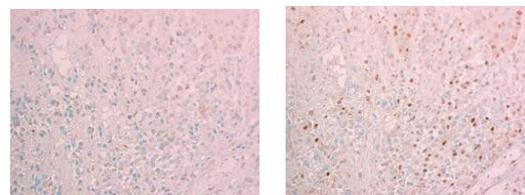


図 3: 歯周炎歯肉におけるTIMP-3(左)およびTIMP-4(右)免疫染色所見

(まとめ)

本研究は歯肉増殖症および歯周炎歯肉においてTIMP-3およびTIMP-4タンパク質の局在を観察し、発現細胞を同定した初の報告である。しかしながら、MMPsやTIMP-1、-2との

関連やその病態におけるバランスについては不明のままであり、今後更なる解析が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Abe D, Kubota T, Shimizu T, Morozumi T, Nakasone N, and Yoshie H: Altered gene expression in leukocyte transendothelial migration and cell communication pathways in periodontitis-affected gingival tissues. *J Periodontal Res* in press.
2. Shimizu T, Kubota T, Nakasone N, Abe D, Morozumi T, and Yoshie H: Microarray and quantitative RT-PCR analyses in calcium-channel blockers induced gingival overgrowth tissues of periodontitis patients. *Arch Oral Biol* 2011; 56: 277-284.
3. Nakasone N, Kubota T, Hoshino C, Nohno K, Itagaki M, Shimizu T, Yoshie H: Differential gene and protein expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-3 and TIMP-4 in gingival tissues from drug induced gingival overgrowth. *Arch Oral Biol* 2009; 54: 634-641.
4. Hashimoto E, Nakakura-Ohshima K, Kenmotsu S, Suzuki H, Nakasone N, Saito C, Harada H, Ohshima H: The relationship between the cusp pattern and plural stem cell compartments in guinea pig cheek teeth by chasing BrdU-labeling. *Arch Histol Cytol* 2008; 71: 317-332.
5. Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H: Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 773-783.
6. Kubota T, Itagaki M, Morozumi T, Maruyama S, Nakasone N, Shimizu T, Saku T, Yoshie H: A case report of multi-drug induced gingival overgrowth with TIMP-3 over-expression. *Oral Med Pathol* 2008; 12: 141-148.

[学会発表] (計 5 件)

1. 久保田 健彦, 阿部 大輔, 清水 太郎, 中曾根 直弘, 両角 俊哉, 吉江 弘正: アルツハイマー病関連遺伝子は歯周炎罹患歯肉において転写発現亢進している. 第 53 回秋季日本歯周病学会大会, 2010 年 9 月 20 日, 徳島
2. Kubota T, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T and Yoshie H: Alzheimer's disease pathway was accelerated in periodontitis-affected gingival tissues. International Association for Dental Research, 2010.07.14-17, Balcerona
3. Shimizu T, Kubota T, Abe D, Morozumi T, Nakasone N, Yoshie H: Transcriptomes in sites

with drug-induced gingival-overgrowth Microarray and qRT-PCR analyses. EUROPERIO6, 2009. 6. 4-6, Stockholm.

4. Abe D, Kubota T, Shimizu T, Morozumi T, Nakasone N, Yoshie H: Comprehensive gene expression analysis of gingival tissues affected by localized chronic periodontitis. EUROPERIO6, 2009. 6. 4-6, Stockholm
5. 中曾根 直弘, 久保田 健彦, 星野 千華, 板垣 真奈美, 清水 太郎, 吉江 弘正: カルシウム拮抗薬誘導性歯肉増殖症歯肉組織における tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) -3, -4 遺伝子発現およびタンパク質局在. 第 51 回秋季日本歯周病学会大会, 2008 年 10 月 19 日, 四日市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中曾根 直弘 (NAKASONE NAOHIRO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号 : 20447634

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号：